

黄瓜花原基的形成及与 Ca^{2+} 的关系*

陶月良¹, 曾广文², 陈 勇¹

(1 温州师范学院生物与环境科学系, 浙江 温州 325027; 2 浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310029)

摘要:以黄瓜为试验材料研究了肉眼可见的花原基突起之前, 花原基早期的分化过程。结果显示花原基分化和开花的起始节位是第一真叶节; 肉眼可见花原基突起前早期的分化是在叶腋亚表皮部位形成一个球形花原基起始细胞团, 此细胞团进一步分裂、扩大形成肉眼可见的花原基突起; 第一真叶节的花原基起始细胞团分化集中发生于 6~7 d 苗龄时期; Ca^{2+} 在花原基起始细胞团细胞中主要分布在细胞壁和细胞间隙, 而在非起始细胞团的叶腋亚表皮细胞则主要分布在液泡中, 并对 Ca^{2+} 在花原基起始细胞团分化中的作用进行了讨论。

关键词: 黄瓜; 花原基形成; 花的分化

中图分类号: Q 944.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2003)02-0230-05

Studies on the Formation of Floral Primordium and Relation to Ca^{2+} in *Cucumis sativus*

TAO Yue-Liang¹, ZENG Guang-Weng², CHENG Yong¹

(1 Department of Biological and Environmental Sciences, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027, China;

2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Early differentiation of floral primordium before the appearance of megascopic primordia protuberance was investigated in *Cucumis sativus* L. The results showed that the differentiation of floral primordium and flower firstly occurred at the axil of the first leaf. Before the appearance of megascopic primordia protuberance, a spherical cell aggregate with active cell division appeared at subepidermis as an early primordium at 6-7 day age of seedlings. Subsequently, the cell aggregate further divided and formed the megascopic primordia protuberance. The component cells of the cell aggregate contain more Ca^{2+} than neighbouring subepidermal cells at the axil of the first leaf. Furthermore Ca^{2+} mainly distributed at cell wall and intercellular space. However, for the neighbouring cells at subepidermis at the axil of the first leaf, Ca^{2+} mainly distributed in vacuoles. The function of Ca^{2+} at cell wall and intercellular space on the differentiation of the early primordia tissue was discussed.

Key words: *Cucumis sativus*; Floral primordium formation; Floral differentiation

黄瓜是我国主要瓜类蔬菜之一, 栽培很普遍且有悠久历史。由于食用部分是其果实, 因

* 基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(396061)

收稿日期: 2002-08-15, 2002-12-09 接受发表

作者简介: 陶月良(1964-)男, 浙江省嘉兴市人, 硕士, 副教授, 主要从事植物生理生化研究。

此人们对黄瓜花的分化发育和性别形成十分关注。黄瓜花芽分化不象部分茄科和十字花科在茎生长点分化,黄瓜的茎生长点只分化叶芽,花芽是在生长到一定程度的叶芽内侧进行分化的。以往对黄瓜花芽分化的研究是从肉眼看到花原基突起开始(山东农业大学,1985;日本农山渔村文化协会,1985;中国农业科学院蔬菜研究所,1993;Judson,1929),而对原基突起形成以前的过程,即花原基形成的早期过程未曾见有报道。本文目的是研究黄瓜花原基是如何形成的,以求对黄瓜花的分化、发育有一个比较系统的完整的认识。

1 材料与方法

1.1 实验材料 供试材料为黄瓜 (*Cucumis sativus*) (品种:津春4号、津研4号、杨行)。种子用自来水漂选,洗净后用10%次氯酸钠杀菌8 min,再用无菌水冲洗3次,于 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 黑暗中吸胀6 h,然后将种子平铺于垫有湿润滤纸的培养皿中,暗处萌发24 h,待胚根长达0.5 cm时种植于湿沙中,种子上面覆盖沙层,厚度为0.5~1 cm,置于 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$,光强为 $160 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下育苗,每天光照14 h,其间经常喷雾保湿,从4 d苗龄幼苗开始每隔12 h取样,连序取样9次,每次取20株进行石蜡切片制作和光学显微镜观察花原基的形成过程及 Ca^{2+} 的细胞化学定位。

1.2 实验方法

1.2.1 石蜡切片制作 材料用Carnoy液固定,按孙敬三(1986)方法包埋,做连序纵向切片,厚度为6 μm ,用铁矾-苏木精染色及PAS染色。

1.2.2 Ca^{2+} 的细胞化学定位 参照Slocum等(1982)和Borger等(1982)方法,加以修改。将样品组织块迅速投入用2%焦锑酸钾(pH7.6,用100 mmol/L pH 7.1磷酸缓冲液配制)配制的3%戊二醛固定液中,于 4°C 初固定3 h,然后用含2%焦锑酸钾的磷酸缓冲液(pH7.6)洗涤3次,每次约0.5 h。再用2%焦锑酸钾(pH7.6)配制的1%钨酸于 4°C 固定过夜。再用重蒸水洗涤3次及用pH10.0的重蒸水洗涤2次,每次约0.5 h。随后经系列冷乙醇脱水,环氧树脂Epon 812包埋,LKB-8800型超薄切片机切片,切片经1.5%醋酸双氧铀染色,于透射电镜下观察拍照。对照片在电镜下确定有电子致密物的沉淀片后,将该片的铜网漂浮于100 mmol/L的EGTA(pH8.0)溶液中, 60°C 处理1 h再进行观察拍照。

2 结果与分析

2.1 花芽分化的起始节位

根据我们对津春4号、津研4号和杨行3个品种的沙培和土培第28 d幼苗的肉眼观察结果,有95%以上的植株在第一真叶叶腋处出现1至2个花芽,但绝大多数为1个(表1),并最终开花(图版I:1)。第二真叶节位及其以下节位通常产生簇生花。

表1 黄瓜幼苗花芽分化节位及花芽数

Table 1 The nodes and number of differentiation of floral buds in <i>Cucumber seedlings</i>						
节 位 (nodes)	津春4号		津研4号		杨 行	
	沙培	土播	沙培	土播	沙培	土播
子叶节叶腋 axils of first node	0	0	0	0	0	0
第一节叶腋 axils of first node 无花芽 have no flower bud	1	4	2	5	4	5
具1个花芽 have one flower bud	78	90	76	92	80	88
具2个花芽 have two flower buds	21	6	22	3	16	7

注:表中数据为占总株数的百分比(%) (以肉眼可辨为准)。
Note: the data on the table were percent of total plant number (index by eye)

2.2 花原基起始细胞团的形成

图版 I : 2-a , 2-b , 2-c 分别展示种子萌发后 5 d、6 d 和 7 d 苗龄的幼苗第一真叶节叶腋亚表皮处在花原基启动细胞团开始形成过程中的变化。5 d 苗龄幼苗第一真叶节叶腋亚表皮部位的细胞看不出有什么变化 (图版 I : 2-a) , 而在 6 d 苗龄的幼苗 (此时两片子叶的夹角尚小于 180°) 第一真叶节叶腋亚表皮部位出现清晰可见的细胞团的结构 (图版 I : 2-b) , 在 7 d 苗龄的幼苗第一真叶节叶腋亚表皮部位的细胞团结构向叶腋表皮生长并形成突起 (图版 I : 2-c) 。从图版可以看出花原基最早起始于亚表皮细胞 , 但它是由一个细胞分化而成还是由几个细胞同时分化而成尚不清楚。

2.3 Ca²⁺ 的细胞化学定位

图版 I : 3-a 为第一真叶叶腋亚表皮细胞 , 图版 I : 3-b 为第一真叶叶腋花原基起始细胞团细胞。从图版可见 , 花原基起始细胞团的细胞比叶腋亚表皮细胞有更多的焦锇酸钙沉淀颗粒 , 而且主要分布在细胞壁和细胞间隙。在花原基起始细胞团细胞的焦锇酸钙沉淀有两种形式 , 一是圆而大的颗粒 , 另一种是呈小而密集的云雾状 , 在细胞内很少能看到焦锇酸钙沉淀颗粒。与之相反 , 在叶腋亚表皮细胞内的焦锇酸钙沉淀颗粒多分布于液泡内 , 呈絮状 , 零星分布 , 在细胞壁和细胞间隙仅有极少量的细小颗粒的 Ca²⁺ 沉淀物。

2.4 花原基起始细胞团形成的时间进程

根据对黄瓜幼苗第一真叶叶腋花芽分化时间进程的观察 , 黄瓜第一真叶节花原基起始细胞团启动分化时间为 6 d 苗龄的幼苗 , 而且分化时间非常集中 , 大部分集中在 24 h 内完成 (表 2) 。说明其材料的整齐度较好。

表 2 黄瓜幼苗第一真叶叶腋花原基起始细胞团分化的时间进程 (品种 : 津春 4 号)

Table 2 The time course of differentiation of floral buds at first leaf axils in Cucumber seedlings

重复次数 (repeated times)	苗龄/天 (seedling days)							
	5		6		7		8	
	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h
1	0 (0)	0 (0)	7 (35)	9 (45)	3 (15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	0 (0)	4 (20)	12 (60)	2 (10)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	5 (25)	10 (50)	4 (20)	1 (5)	0 (0)	0 (0)

注 : 括号内数字为花芽分化株数占总株数的百分比 (%) , 花芽分化以出现细胞团为准

Note : the data in brackets on table were percent of differentiation number to total plant number (index by cell mass)

3 讨论

以前认为黄瓜植株上最早观察到的花芽一般在发芽后 10 d 左右 , 第一片真叶展开时在其第 3 ~ 4 节叶腋处 (日本农山渔村文化协会 , 1985) 。但据我们对津春 4 号、津研 4 号和杨行 3 个品种的观察结果均在第一真叶节位就发生花原基的分化并开花。在肉眼可见的花原基突起之前 , 在 6 ~ 7 d 苗龄时 , 先在亚表皮部位分化形成一个球状的花原基起始细胞团 , 细胞团进一步分裂、扩大形成花原基突起。这些现象的不同很可能是由于品种不同造成 , 即不同黄瓜品种其生殖生长的起始时间有较明显的差异。

高等植物花发育要经历花诱导、花分生组织形成、花器官原基起始和花器官发育 4 个阶段。花原基起始细胞团是如何形成的 ? Johri 等 (1983) 在玉米的克隆分析研究中指出 , 在玉米干种子时期 , 在茎尖分生组织中大约有 4 个细胞已经定型为产生顶端雄性花序或雄花穗的

原始细胞。黄瓜与玉米不同，玉米雄花穗是从茎尖分生组织形成，而黄瓜则是在叶芽内侧产生，因此腋生花芽分化有其特异性。Singer 等（1986，1987）在烟草上的研究指出，诱发腋芽和节间的花决定细胞不是从顶端分生组织的花决定细胞克隆得到，而是由于一种可传递的信号对各个不同的、有分化潜能的组织作用的结果。如此看来，可以推测黄瓜花原基起始细胞团的分化、形成，也可能是叶腋亚表皮某些有分化潜能的细胞接受了某种可传递的信号刺激而诱发分裂。这一点在我们对花芽分化起始细胞团细胞和非起始细胞团的亚表皮细胞的 Ca^{2+} 细胞定位比较中的明显差异得到启示。花原基起始细胞团的细胞比叶腋亚表皮细胞有更多的焦锇酸钙沉淀颗粒，而且主要分布在细胞壁和细胞间隙。与之相反，在叶腋亚表皮细胞内的焦锇酸钙沉淀颗粒多分布于液泡内，呈絮状，零星分布，在细胞壁和细胞间隙仅有极少量的细小颗粒的 Ca^{2+} 沉淀物。胞外钙可起信使作用，通过调节受 G 蛋白调控的质膜 Ca^{2+} 通道引起 Ca^{2+} 内流，从而使胞内游离 Ca^{2+} 上升，激活依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶（马力耕等，1998；Ma 等，1999）。此外， Ca^{2+} 参与纺锤体和细胞板的形成，因此它调节有丝分裂和胞质分裂（Hepler 等，1981）。看来，胞外钙的增加可能与花原基起始细胞团的分化有着密切关系。

由于黄瓜是一种自主开花植物（autonomus flowering plants），花的起始诱导不要求特定的光周期，那么引起花原基起始细胞团分化的信息级连反应的原初信号是什么？又是什么原因导致 Ca^{2+} 含量在分化细胞增加，特别是在细胞壁和细胞间隙显著地多？这些问题都有待研究。

〔参 考 文 献〕

- 山东农业大学主编，1985. 蔬菜栽培学各论北方版 [M]. 北京：农业出版社，192
- 日本农山渔村文化协会编，北京农业大学译，1985. 蔬菜生物生理学基础 [M]. 北京：农业出版社，35
- 中国农业科学院蔬菜研究所主编，1993. 中国蔬菜栽培学 [M]. 北京：农业出版社，541
- 孙敬三，1986. 植物细胞学研究技术 [M]. 北京：科学出版社，34
- Borgers M, Thone FJM, Xhonneus BJM, 1982. Localization of calcium in red bloodous cell [J]. *J Histochem Cytochem*, **31**: 1109—1116
- Hepler PK, Wick SM, Wolniak, SM, 1981. The structure and role of membrance in the mitotic apparatus. In: H. G. Scheiger, International Cell Biology [M] 1980—1981 ed. Berlin: Springer-Verlag, 673—686
- Johri MM, Coe EHJ, 1983. Clonal analysis of corn plant development. I. The development of the tassel and the ear shoot [J]. *Dev Biol*, **97**: 154—172
- Judson JE, 1929. The morphology and vascular anatomy of the pistillate flower of cucumber [J]. *Amer J Bot*, **16**: 69—86
- Ma LG (马力耕), Xu XD (徐小冬), Cui SJ (崔素娟), et al, 1998. The involvement of phosphoinositide pathway in the initiatory effects of extracellular calmodulin on pollen germination and tube growth [J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), **24** (2): 196—200
- Ma Ligen, Xu Xiaodong, Cui Sujuan, et al, 1999. The Presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tuber growth [J]. *The Plant Cell*, **11** (7): 1351—1363
- Singer SR, McDaniel CN, 1986. Floral determination in the terminal and axillary buds of *Nicotiana tabacum* L [J]. *Dev Biol*, **118**: 587—592
- Singer SR, McDaniel CN, 1987. Floral determination in internode tissues of day-neutral tobacco first occures many nodes below the apex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 2790—92
- Slocum R, Roux SJ, 1982. An improved method for the subcellular localization of calcium using a modification of the antimonite precipitation technique [J]. *J Histochem Cytochem*, **30**: 617—629

图版 I 说明

1. 黄瓜幼苗第一节位开花 (品种：津春 4 号)；2. 第一真叶叶腋花原基起始细胞团 (品种：津研 4 号) ($\times 320$) 2-a:

5 d 苗龄, 2-b: 6 d 苗龄, 2-c: 7 d 苗龄; 3. Ca^{2+} 在细胞中的分布 (品种: 津春 4 号) 3-a: 叶腋亚表皮细胞, 3-b1, 3-b2: 花原基起始细胞团细胞

Explanation of Plate I

1. The flower of first nodes in cucumber seedlings (cv Jingchun No 4); 2. A promoter cell mass of floral primordia at first leaf axils (cv Jingyan No 4) 2-a: 5-day-old seedlings, 2-b: 6-day-old seedlings, 2-c: 7-day-old seedlings; 3. The distribution of Ca^{2+} deposits in cells (cv jingchun No 4) 3-a: the cortical cells in subepidermal at the axils ($\times 15\ 000$), 3-b1, 3-b2: floral primordia cells ($\times 20\ 000$)

